

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-252293

(43) 公開日 平成7年(1995)10月3日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 H 19/173

19/207

// C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

A 9453-4B

9281-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数12 書面 (全 17 頁)

(21) 出願番号

特願平6-79163

(22) 出願日

平成6年(1994)3月12日

(71) 出願人 000236436

浜松ホトニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72) 発明者 杉山 弘

京都府京都市南区東九条南松ノ木町1-1
(3-605)

(72) 発明者 斉藤 烈

京都府京都市山科区勸修寺柴山1-21

(72) 発明者 平松 光夫

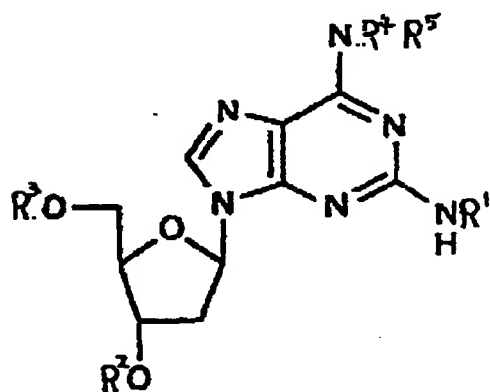
静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ
トニクス株式会社内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54) 【発明の名称】 デオキシリボヌクレオシド誘導体およびその製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 下記一般式で示されるデオキシリボヌクレオシド誘導体。



(式中、R¹ は水素原子、-COCH(CH₃)₂、又は -COCH₂OAr (Arはアリール基を示す) を表し；R² は水素原子又は -P(OCH₂CH₂CN)N(CH(CH₃)₂)₂ を表し；R³ は水素原子又はジ

メトキシトリチル基を表し；R⁴ およびR⁵ は水素原子又は=CHN(R⁶)₂を表し；R⁶ はアルキル基、シクロアルキル基、アリール基、又はアラルキル基を表す。)

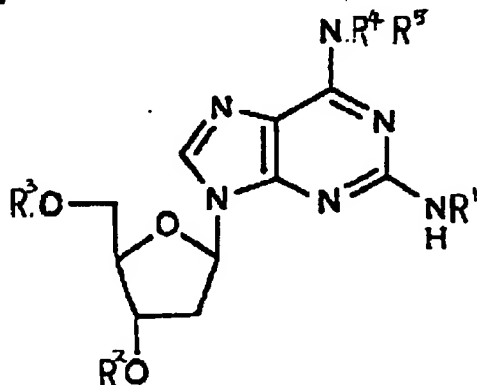
【効果】 通常の脱保護条件(55℃、8時間程度)で、収率良くdA^{NH2}を複数個含むDNAを与えることが可能である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式で示されるデオキシリボヌクレオシド誘導体。

【化1】



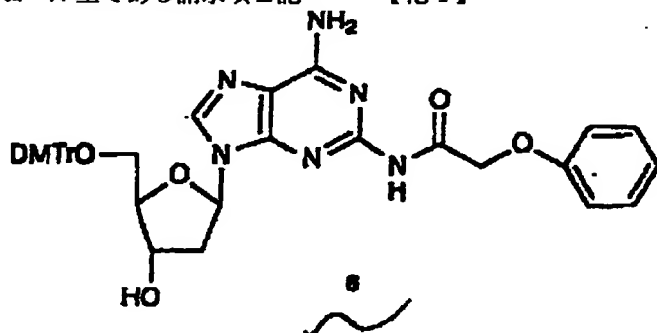
(上記式中、R¹ は水素原子、-COCH (C H₃)₂、又は-COCH₂ OAr (Arはアリール基を示す)を表し；R² は水素原子又は-P (OCH₂ C H₂ CN) N (CH (CH₃)₂)₂を表し；R³ は水素原子又はジメトキシトリチル基を表し；R⁴ およびR⁵ は水素原子又は=CHN (R⁶)₂を表し；R⁶ はアルキル基、シクロアルキル基、アリール基、又はアラルキル基を表す。)

【請求項2】 前記R⁴ およびR⁵ が=CHN (R⁶)₂である請求項1記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

【請求項3】 前記R⁶ が炭素数1～4の低級アルキル基である請求項2記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

【請求項4】 前記R⁶ がブチル基である請求項3記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

【請求項5】 前記R⁶ がフェニル基である請求項2記*



【請求項10】 下記式で示される請求項1記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

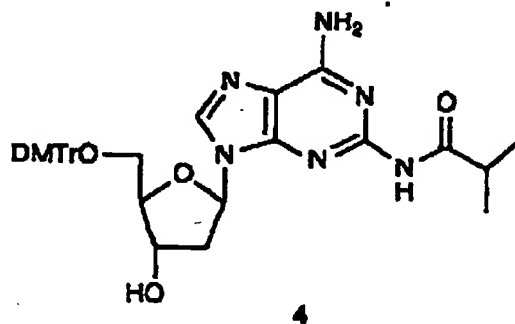
※

* 載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

【請求項6】 前記R⁶ がシクロヘキシル基である請求項2記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

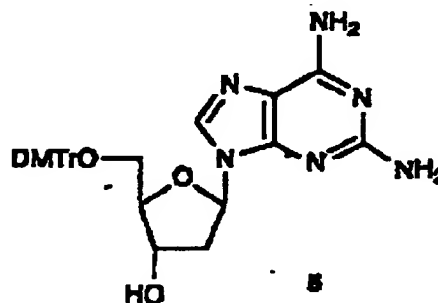
【請求項7】 下記式で示される請求項1記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

【化2】



【請求項8】 下記式で示される請求項1記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

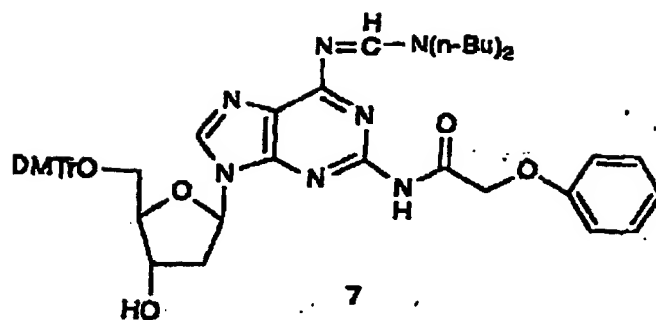
【化3】



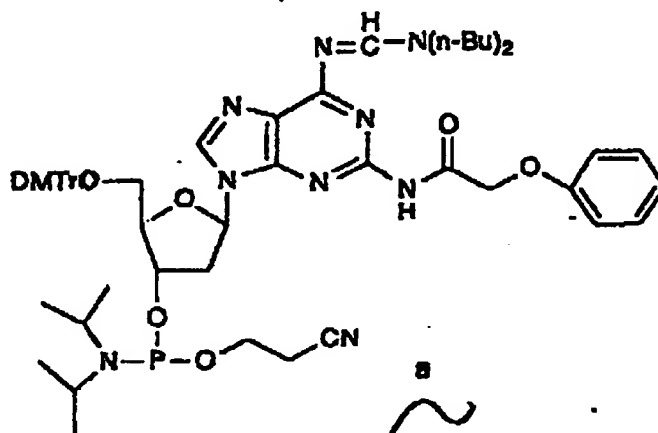
【請求項9】 下記式で示される請求項1記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。

【化4】

※【化5】



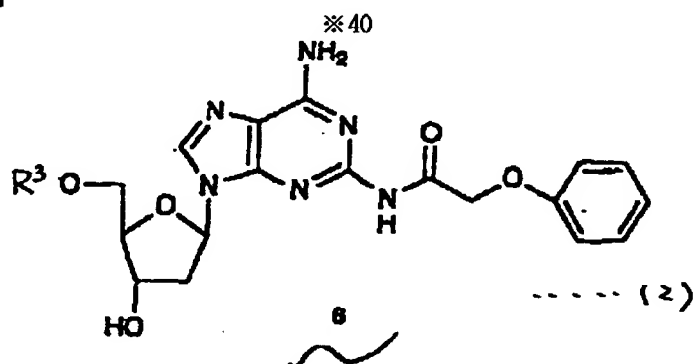
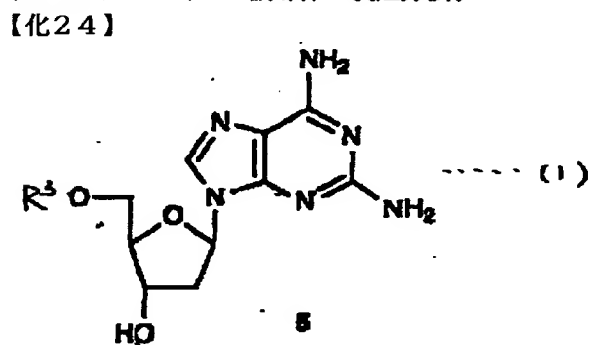
【請求項11】 下記式で示される請求項1記載のデオキシリボヌクレオシド誘導体。



【請求項12】 下記一般式(1)で示されるデオキシリボヌクレオシド化合物にトリメチルクロロシランを反応させた後、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)およびフェノキシアセチルクロリド(PAC1)を更に反応させて、下記一般式(2)で示されるデオキシリボヌクレオシド誘導体を得ることを特徴とするデオキシリボヌクレオシド誘導体の製造方法。

※【化25】

30



5

(上記式中、 R^3 は水素原子又はジメトキシトリチル基を表す。)

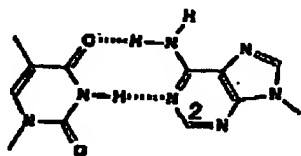
【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、オリゴヌクレオチドないしポリヌクレオチドの合成に有用なモノマーユニットたる、デオキシリボヌクレオシド誘導体およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】2-アミノアデニン(2-amino A)は、下記式(化7)に示すようにチミン2位のカルボニル基と3本目の水素結合を形成する。したがって、2本の水素結合しか形成しない塩基対(化8)に比較して、2-amino Aを含むポリヌクレオチド(以下においては、「オリゴヌクレオチド」を包含する意味で用いる)は、チミンを含むポリヌクレオチドと、より安定な塩基対を形成することが可能である。このような3本目の水素結合を形成するポリヌクレオチドは、アンチ*



T-A base pair

従来より、2-アミノ-2'-デオキシアデノシン(dA_{NH_2})を含むDNAの合成(例えば、2-amino Aを複数個含むDNAの合成)は、酵素法(K. H. Scheit and H.-R. Rackwitz, Nucleic Acids Res., 10, 4059-4069, 1982)あるいはトリエステル法(B. L. Gaffney et al. Tetrahedron, 40, 3-13, 1984; A. Chollet et al. Chimica Scripta, 26, 37-40, 1986)により行われて来た。

【0005】しかしながら、前者の酵素法では、DNA配列の所望の部分(サイト)に2-amino Aを導入することができず、また大量の合成が困難であった。

【0006】また、後者のトリエステル法では、2-amino Aを所望の部分に導入可能であるが、用いる試薬の反応性が低いため、長鎖のDNA(20量体以上)を合成することは困難であった。

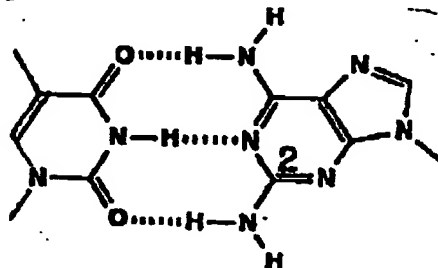
【0007】上述した酵素法あるいはトリエステル法の欠点を解消する目的で、ホスホロアミダイト法を用いたDNA合成法が検討されており、特にこのホスホロアミダイト法を用いたDNA合成機による自動合成が強く望まれている。

6

*センス法ないしハイブリダイゼーション用のプローブとして、より有効であると考えられている。

【0003】

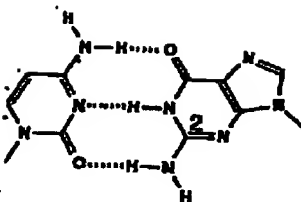
【化7】



T-2NH₂A base pair

【0004】

【化8】



C-G base pair

※【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来報告されたホスホロアミダイト法による合成(W. J. Chazin, M. Rance, A. Chollet, W. Leupin, Nucleic acids Res., 19, 5507-5513, 1991)においては、脱保護条件が過酷(55°C、2~5日間)なため、2-amino Aを複数個含むDNA、更には他の不安定な修飾ヌクレオシドをも含むDNAを収率よく得ることはできなかった。

【0009】したがって、本発明の目的は、上述した従来技術の欠点を解消できるデオキシリボヌクレオシド誘導体およびその製造方法を提供することにある。

【0010】本発明の他の目的は、ポリヌクレオチドの合成に好適に使用可能なモノマーユニットたるデオキシリボヌクレオシド誘導体、およびその製造方法を提供することにある。

【0011】本発明の更に他の目的は、温和な条件で脱保護が可能なホスホロアミダイト保護基を有するモノマーユニットたるデオキシリボヌクレオシド誘導体、およびその製造方法を提供することにある。

【0012】本発明の更に他の目的は、ポリヌクレオチドないしDNAを収率よく合成可能なモノマーユニット

7

たるデオキシリボヌクレオシド誘導体、およびその製造方法を提供することにある。

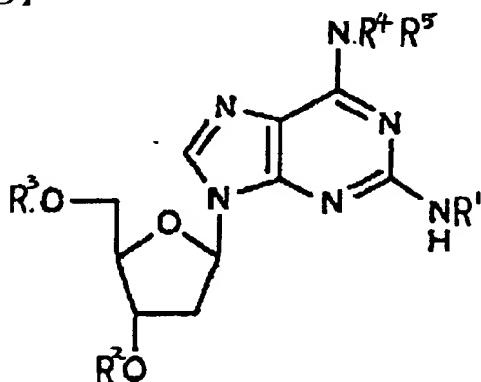
【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の結果、アリロキシアセチル基(-COCH₂OAr)等を、従来脱保護が困難であったアデニン2-位のアミノ基保護基として用いることが極めて有効であることを見出した。

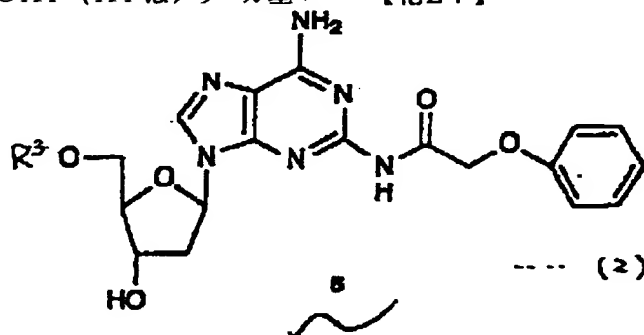
【0014】本発明のデオキシリボヌクレオシド誘導体は上記知見に基づくものであり、より詳しくは、下記一般式で示されるものである。

【0015】

【化23】



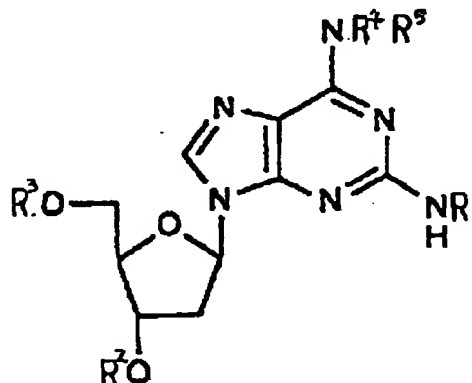
(上記式中、R¹ は水素原子、-COCH(CH₃)₂、又は-COCH₂OAr (Arはアリール基※



(上記式中、R³ は水素原子又はジメトキシトリチル基を表す。)以下、必要に応じて図面を参照しつつ、本発明を詳細に説明する。(デオキシリボヌクレオシド誘導体)本発明のデオキシリボヌクレオシド誘導体は、下記一般式で示される構造を有する。

【0018】

【化9】



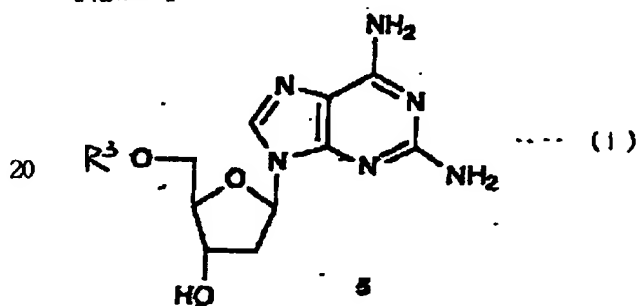
上記式中、R¹ は水素原子、-COCH(CH₃)₂、又は-COCH₂OAr (Arはアリール基を示す)を表す。このアリール基は、炭素数6~14 (更には6~

8

※を示す)を表し; R² は水素原子又は-P(OCH₂CH₂CN)N(CH(CH₃)₂)₂を表し; R³ は水素原子又はジメトキシトリチル基を表し; R⁴ およびR⁵ は水素原子又は=CHN(R⁶)₂を表し; R⁶ はアルキル基、シクロアルキル基、アリール基、又はアラルキル基を表す。)本発明によれば、更に、下記一般式(1)で示されるデオキシリボヌクレオシド化合物にトリメチルクロロシランを反応させた後、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)およびフェノキシアセチルクロリド(PAC1)を更に反応させて、下記一般式(2)で示されるデオキシリボヌクレオシド誘導体を得ることを特徴とするデオキシリボヌクレオシド誘導体の製造方法が提供される。

【0016】

【化26】



【0017】

【化27】

10)のアリール基が好ましく、フェニル基が特に好ましい。このフェニル基の環上には、適宜置換基が結合していてもよい。置換基がある場合には、該置換基はオルト位、メタ位、および／又はパラ位のいずれ（ないしは2以上の位置）に結合していてもよいが、特にパラ位が好ましい。この置換基がアルキル基である場合には、炭素数1～4の低級アルキル基が好ましい。デオキシリボヌクレオシド誘導体の溶媒への溶解性等の点からは、該アルキル基はブチル基（特にターシャリーブチル基）が好ましい。

【0019】上記式中、 R^2 は水素原子又は $-P(OC_2H_4CH_2CN)_2$ を表す。

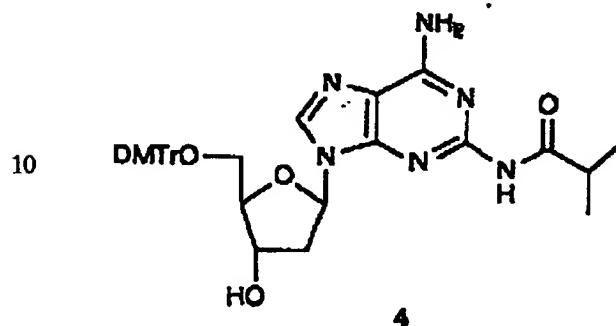
【0020】上記式中、 R^3 は水素原子又はジメトキシトリチル基を表し； R^4 および R^5 は水素原子又は $=CHN(R^6)_2$ を表す。この R^6 はアルキル基、シクロアルキル基、アリール基、又はアラルキル基のいずれであつてもよいが、アルキル基としては、炭素数1～4の低級アルキル基が好ましく、炭素数2～4の低級アルキル基が更に好ましく、炭素数4のブチル基（例えば、 n -ブチル基）が特に好ましい。

【0021】 R^6 のシクロアルキル基は、炭素数4～7（更には5～6）のシクロアルキル基が好ましく、シクロヘキシル基が特に好ましい。 R^6 のアリール基は、炭素数6～14（更には6～10）のアリール基が好ましく、フェニル基が特に好ましい。 R^6 のアラルキル基（aralkyl）基は、炭素数7～8のアラルキル基が好ましく、ベンジル基（ $-CH_2C_6H_5$ ）が特に好ましい。

*【0022】本発明のデオキシリボヌクレオシド誘導体の特に好ましい態様を、下記式（化10）～（化14）に示す。

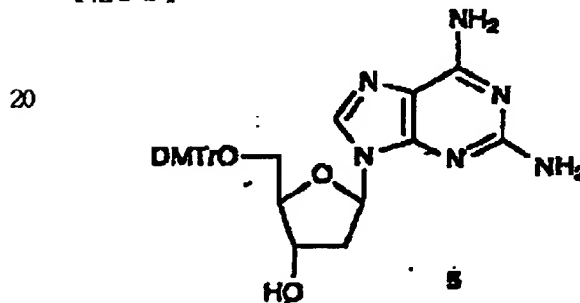
【0023】

【化10】



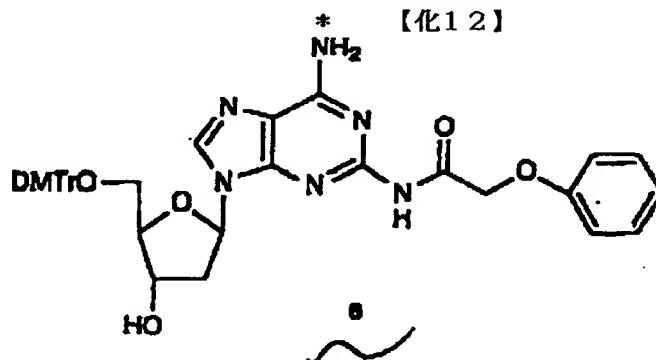
【0024】

【化11】



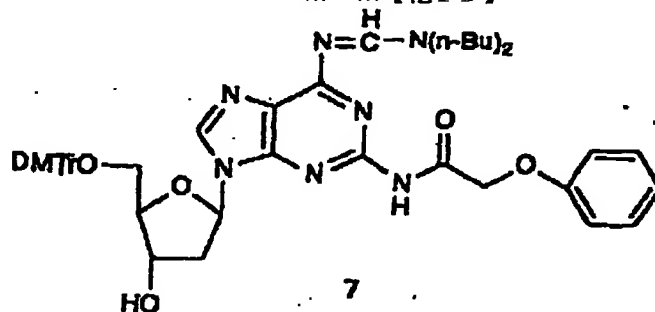
【0025】

【化12】



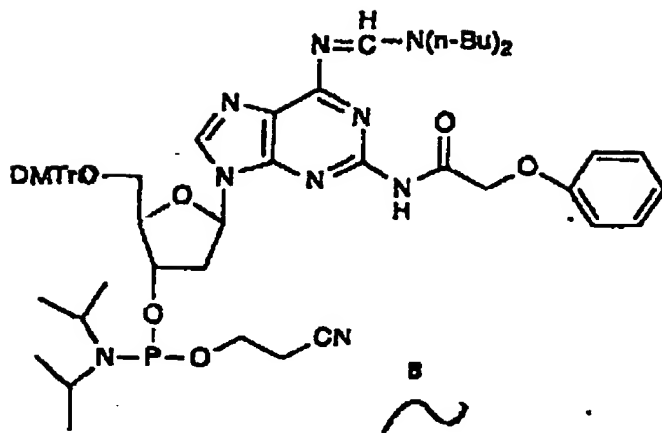
【0026】

※ ※【化13】



【0027】

★ ★【化14】



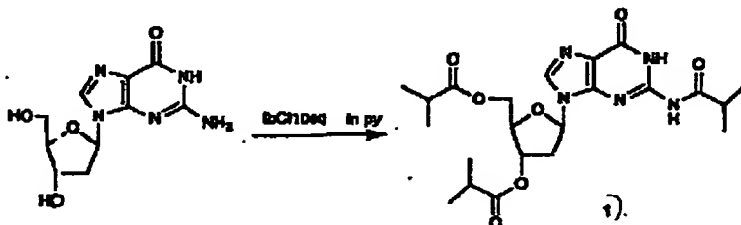
(デオキシリボヌクレオシド誘導体の合成) 上記式 (化10) ~ (化14) に示すデオキシリボヌクレオシド誘導体は、例えば、以下のようにして合成することが好ましい。

【0028】すなわち、アデニン2位のアミノ基の保護にフェノキシアセチ基、6位のアミノ基の保護にN, N-ブチルホルムアミジル基 (L. J. McBride et al, J. Am. Chem. Soc. 108, 2040-2048, 1986; E. C. Floehl et al. Nucleic Acids Re*

* search 11, 8031, 8036, 1983) を用いて、下記式 (化15) ~ (化20) に示すように、2'-デオキシグアノシンからホスホロアミダイド化を行なうことが、収率の点から好ましい。下記式において、化合物 (2) の合成は、Jonesらの方法 (Tetrahedron, 1984, 40, 3~13) により行うことが好ましい。

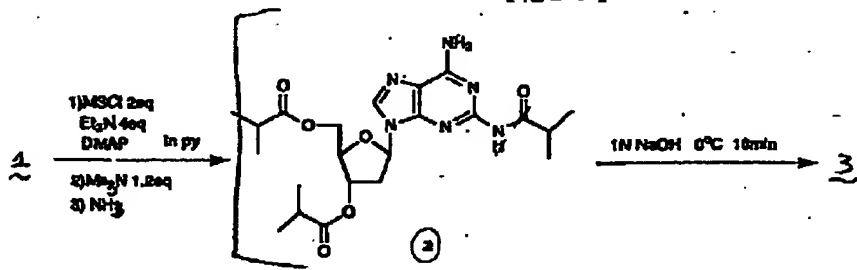
【0029】

【化15】



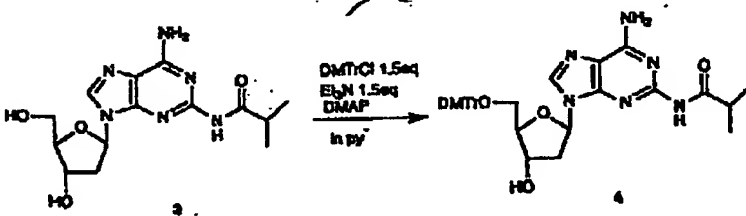
【0030】

※ ※ 【化16】



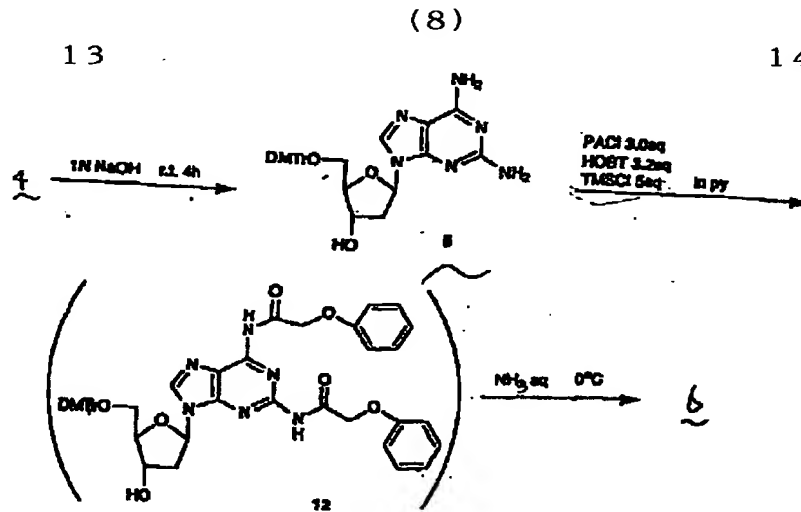
【0031】

★ 40 ★ 【化17】



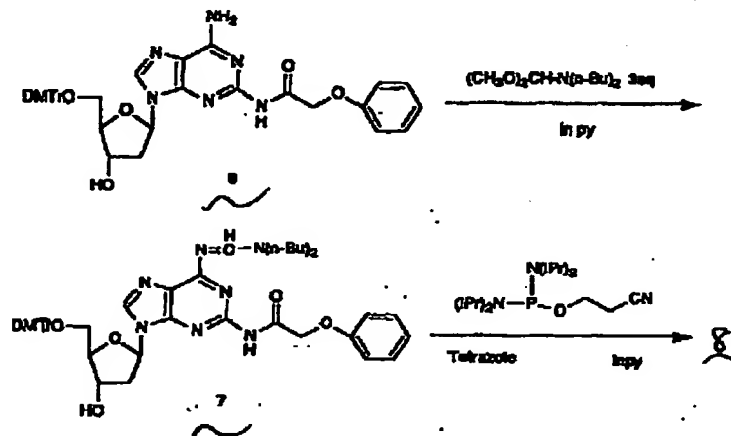
【0032】

☆ ☆ 【化18】



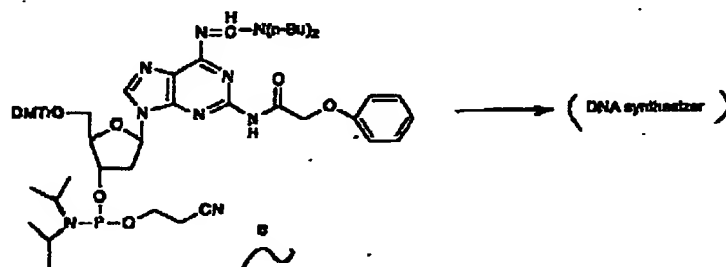
【0033】

* * 【化19】



【0034】

* * 【化20】



上記(化15)～(化20)式中、IbClはイソブチルクロリド、pyはピリジン、MsClはメシチレンスルホニルクロリド、Et₃Nはトリエチルアミン、DMAPはジメチルアミノピリジン、Me₃Nはトリメチルアミン、DMTrClはジメトキシトリチルクロリド、PAClはフェノキシアセチルクロリド、HOBTは1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、TMSClはトリメチルクロロシランをそれぞれ示す。

【0035】なお、上記化合物(3)の合成は、文献(B. L. Gaffney et. al. Tetrahedron, 40, 3-13, 1984)に従い、その後2位をいったん脱保護し、改めて2位および6位に保護基をかけ直している。本発明者の知見によれば、化合物★50

★物(4)の6位を保護した後のホスホロアミダイト合成は、保護基が通常の脱保護条件で外れにくいと考えられる。

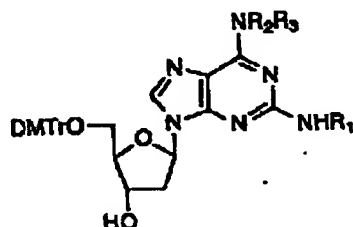
【0036】上記化合物(12)を合成して、モノマーユニットとして用いることは、本発明者の実験によれば、ホスホロアミダイト化において少量の分解物が確認され、また該化合物の精製もその不安定性のため困難であった。

【0037】化合物(6)をベンゾイル化してホスホロアミダイト化することは、本発明者の実験によれば、適切なベンゾイル化は困難であった。これは、本発明者の知見によれば、立体障害、もしくは酸クロライドの反応性によるものと考えられた。これに対して、N, N-ジ

15

ブチルホルムアミジル基を使用した場合には、上記のような問題点は生じなかった。

【0038】上記した反応(化18)を用いることにより、2位アミノ基の選択的保護が可能となり、化合物(5)から化合物(6)を効率的に合成することができる。



Z-R₁=PA,
(9-R₁=t-Bu
10-R₁=Bz
11-R₁=t-Bu
12-R₁=PA

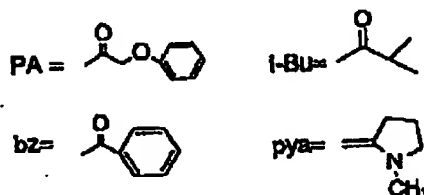
R₂, R₃= =CHN(nBu)₂
R₂=Bz, R₃=H
R₂=Bz, R₃=H
R₂, R₃=pyrrolidine-amidine(pya)
R₂=PA, R₃=H

16

*【0039】また、化合物(7)を精製するに際しては、逆相クロマトグラフィーが特に好ましく使用可能である。(脱保護条件)

【0040】

【化21】



2-アミノ-2'-デオキシアデノシンを含むDNAの合成については、化合物(9)~(11)がモノヌクレオチドとして使用可能である。しかしながら、その保護基が過酷な脱保護条件(例えば、28%NH₄OH, 55℃, 2~5日間)を必要とする場合には、オリゴマーは低収率でしか得られない。

【0041】上記化合物(7)がどの程度の反応時間ないし条件で脱保護されるかを、確認するため、d2-amino ATとdGTという2種のダイマーを作製し、28%NH₄OH中、37℃に加熱し、HPLC(高性能液体クロマトグラフィー)を用いて原料の経時変化を調べ、脱保護の半減期および終了時間を求めた。この場合のHPLC分析条件は、グラジェント CH₃CN 0-25%/15min, 緩衝液:50mM Ammonium formateであった。

【0042】この結果、以下の半減期および反応終了時間が得られた。

2-amino A 半減期=20分, 終了時間=2時間

G 半減期=2時間, 終了時間=16時間

以上の結果から、化合物(7)の保護基は通常の脱保護条件(55℃, 8h)で脱保護されることが確認された。すなわち、この化合物(7)の保護基は、2-amino Aの保護として特に好ましい。

【0043】以下実施例により、本発明を更に具体的に説明する。

【0044】

【実施例】実施例1

2-N-Isobutyryl-2-amino-2'-deoxyadenosine (3)の合成

化合物(2) 4.45g (9.34mmol)に1※50

20※N NaOH (Pyridine:MeOH:H₂O=65:30:5) 46.7mlを加え0℃, 10min 攪拌した。5% NH₄Cl aq 188mlを加えた後、溶媒を留去した。AcOEt (酢酸エチル) 50ml, H₂O 50mlで分液し、水層を冷却して一晚放置して再結晶したものを集めた。

【0045】収量 2.36g (7.01mmol) 収率75.1%

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.05 (d, 6H, (CH₃)₂, J=8.5Hz), 2.24 (m, 1H, H3'), 4.94 (t, 1H, 5'-OH, J=5Hz), 5.30 (d, 1H, 3'-OH, J=5Hz), 6.27 (t, 1H, H1', J=8Hz), 8.24 (s, 1H, H8)

実施例2

2-N-Isobutyryl-5'-O-dimethoxytrityl-2-amino-2'-deoxyadenosine (4)の合成

化合物(3) 2.36g (7.01mmol)にdry pyridine 20mlを加えて2回共沸した。dry pyridine 55mlを加えてDimethoxytrityl chloride 3.52g (10.3mmol, 1.5eq), Et₃N 1.43ml (10.5mmol, 1.5eq), 4-dimethylaminopyridine 40mgを加えて、室温で一晩攪拌した。冷却して水を少量加えた後、溶媒を留去した。AcOEt 70ml, H₂O 70mlで分液し、AcOEt層をさらにH₂O 70mlで2回分液した後、無水Na₂SO₄で乾燥し、AcOEtを留去した。残渣をカラムクロマトグラフィーで精製した(MeOH in CH₂Cl₂ 4%)

17

が、一部精製しきれない部分が残った。この不純物は、本発明者の知見によれば、アデニン6位のアミノ基にDimethoxytrityl基が結合して生成したものと推定された。

【0046】粗収量2.67g (4.18mmol)、粗収率60.0%

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.18 (q, 6H, (CH₃)₂ C, J=5Hz), 2.53 (m, 1H, H2'), 2.70-3.08 (m, 2H, H2', Me 2CH), 3.35 (m, 2H, H5'), 3.78 (s, 6H, 2OCH₃), 4.12 (m, 1H, H4'), 4.69 (br, 1H, H3'), 5.69 (br, 2H, NH₂), 6.27 (t, 1H, H1', J=6.4Hz), 6.78 (m, 4H, ph), 7.13-7.45 (m, 9H, ph), 7.86 (s, 1H, H8), 8.38 (br, 1H, N²H)

実施例3

5'-O-dimethoxytrityl-2-amino-2'-deoxyadenosine (5) の合成

化合物(4) 2.57g (4.18mmol) に1N NaOH (Pyridine:MeOH:H₂O=65:30:5) 22.7mlを加え、室温で4h攪拌。AcOEt 100ml, H₂O 100mlで分液し、AcOEt層をさらにH₂O 100mlで2回分液した後、無水Na₂SO₄で乾燥し、AcOEtを留去した。残渣をカラムクロマトグラフィーで精製した。(MeOH in CH₂Cl₂ 5%)

【0047】収量 1.87g (3.29mmol) 収率47.2% (化合物(3)に対して)

¹H NMR (CD₃OD) δ 2.43 (ddd, 1H, H2', J=7.1, 4.5, 2.0Hz), 2.80 (m, 1H, H2'), 3.75 (s, 6H, 2OCH₃), 4.06 (m, 1H, H4') 4.62 (m, 1H, H3') 6.27 (t, 1H, H1', J=7.1Hz), 6.78 (m, 4H, ph), 7.13-7.45 (m, 9H, ph), 7.86 (s, 1H, H8)

実施例4

2-N-Phenoxyacetyl-5'-O-dimethoxytrityl-2-amino-2'-deoxyadenosine (6) の合成化合物(5) 1.87g (3.29mmol) をdry pyridineに溶かして3回共沸した。dry pyridine 20mlに溶かし、Trimethylchlorosilane 2.08ml (16.4mmol, 5eg)を加え、室温で25min攪拌。その後溶液を冷却(溶液A) 1-Hydroxybenzotriazole 1.42g (10.5mmol, 3.2eg)にdry CH₃CNを加えて2回共沸し

18

た。dry CH₃CN 5ml, dry pyridine 5mlに溶かしPhenoxyacetyl chloride 1.37ml (9.9mmol, 3eq)を加え、室温で5min攪拌。その後溶液を冷却(溶液B) 氷冷下、溶液Aを溶液Bにゆっくり加え、室温で一晩攪拌した。冷却しながら飽和重曹水90mlを加え、水90ml, AcOEt 180mlで分液。AcOEtを留去した。このようにして合成した2,6-N-Diphenoxyacetyl-5'-dimethoxytrityl-2-amino-2'-deoxyadenosineをEtOH 100ml, CH₂Cl₂ 40mlに溶かして、よく冷却しNH₃aq 30mlを加えた。約3-4時間攪拌してTLC (薄層クロマトグラフィー、EtOH in CH₂Cl₂ 5%)で2,6-Diphenoxyacetyl-5'-dimethoxytrityl-2-amino-2'-deoxyadenosineの消失を確認した後、熱を加えずにNH₃だけ留去し、その後熱を加え溶媒を留去した。残渣をカラムクロマトグラフィーで精製した。(EtOH in CH₂Cl₂ 5%)

収量2.04g (2.91mmol) 収率88.4%
¹H NMR (CDCl₃) δ 2.46-2.78 (m, 2H, H2'), 3.35 (m, 2H, H5'), 3.73 (s, 6H, 2OCH₃), 4.16 (d, 1H, H, j=3Hz), 4.70 (br, 3H', H3', PhOCH₂), 6.25 (br, 2H, NH₂), 6.44 (t, 1H, H1', J=6.0Hz), 6.70-7.44 (m, 18H, ph), 7.88 (s, 1H, H8), 9.20 (br, 1, N₂H)

【0048】実施例5

2-N-Phenoxyacetyl-6-N-(N,N-dibutylformamidy)l-5'-O-dimethoxytrityl-2-amino-2'-deoxyadenosine (7) の合成化合物(6) 2.04g (3.29mmol) をdry pyridineに溶かして3回共沸した。dry pyridine 12mlに溶かし、N,N-Dibutylformamide dimethylacetate 1.82ml (8.73mmol, 3eg)を加え、室温で2days攪拌。pyridineを留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー(EtOH in CH₂Cl₂ 5%)で精製した。この精製の際、化合物(7)と近いR_f値を持つ不純物を分離するため、更に逆相カラムクロマトグラフィーで精製した(MeOH in H₂O 85%)。この際化合物(7)はMeOH 85%溶液にはほとんど溶けなかったが、そのまま担体上に配置(load)して、カラムの管壁を少量のMeOHで洗浄した。

19

【0049】なお、上記で用いたN, N-Dibutylformamide dimethylacetalは、Nucleic Acid Res., 1983, 11, 8031~36の方法で得た。すなわち、Di-n-butylamine 25ml (0.15mmol)と、N, N-Dimethylformamide dimethylacetal 21.7ml (0.16mmol)とを混合して、100℃, 3日間加熱した。減圧蒸留でN, N-Dibutylformamide dimethylacetal (b. P. 90-92℃/10mmHg)を7.79g (38.5mmol)得た (収率26%)。

【0050】収量: 1.72g (2.05mmol)
収率70.4%

¹H NMR (CD₃ OD) δ 0.95 (td, 6H, 2CH₃, J=7.3, 3.5Hz), 1.40 (m, 4H, 2C-CH₂-C), 1.70 (m, 4H, 2C-CH₃-C), 2.48 (m, 1H, H2'), 3.03 (m, 1H, H2'), 3.29 (m, 2H, H5'), 3.73 (s, 6H, 2OCH₃), 4.14 (m, 1H, H4'), 6.45 (t, 1H, H1', J=6Hz), 6.6-7.5 (m, 18H, ph), 8.23 (s, 1H, H8), 8.98 (s, 1H, N=CH=N)

実施例6

2-N-Phenoxyacetyl-6-N-(N, N-dibutylformamidyl)-5'-O-dimethoxytrityl-2-amino-2'-deoxyadenosine-3'-N, N-diisopropyl (cyanoethyl) phosphoramidite (8) の合成

化合物(7) 139mg (0.166mmol)をゴムシールドボトルに入れ、dry pyridineに溶かして3回共沸した。ボトルにAr (アルゴン)を充填し、dry pyridine 1.5mlに溶かし、0.5M Tetrazole/CH₃ CN 400μl, 2-cyanoethyl-N, N-diisopropyl chlorophoramidite 60μlを加え、室温で30min攪拌した。TLCで原料の消失を確認した。

【0051】飽和重曹水で酢酸を除いたAcOEt 10mlと飽和重曹水15mlで分液し、AcOEt層を飽和重曹水15mlで分液した。無水Na₂ SO₄で乾燥し、AcOEtを留去した。残渣をdry CH₃ CNに溶かしてゴムシールドボトルに入れ、3回共沸した (この後、上記ボトルに、再度Arを充填しておいた)。

粗収量160mg粗収率93.6%

【0052】実施例7

(DNA合成) 上記実施例で得た化合物を用い、市販の

20

自動DNA合成装置 (Applied Biosystems 381A automatic synthesizer)によりDNA合成を行った。15分ごとに担体を28% NH₄ OH 1mlで溶出し、このDNA合成操作を計5回行なった。得られた精製物を60℃, 4hで脱保護し、その後真空濃縮機で溶媒を留去した。オリゴマーの生成はHPLC (TOSOH CCP E)で確認した。(分析条件; gradient CH₃ CN O-20%/20min, Buffer: 50mM Ammonium formate)

【0053】実施例8

(脱保護の条件検討) d2-aminoAT, dGTという2つのダイマーを上記したDNA自動合成機で作製し、その担体に0.4mlの28%NH₄ OHを加え、15min後に精製物を担体から切り出した。このようにして得た精製物を含む溶液を37℃に保温した (保温し始めた時刻をt=15minとする)。時間を測定しながら、溶液を36μlとり、1N酢酸284μl, 0.5Mカコジル酸バッファー (pH=7.0) 80μlを加えて中和し、このようにして採取した溶液のうち20μlをHPLCで分析した (TOSOH CCP E, Column-Chemco ODS-H, gradient: CH₃ CN O-25%/15min, Buffer: 50mM Ammonium formate)。

化合物の物性値

上記の実施例で得られた化合物の物性値は、以下の通りである。

化合物(6)

¹H-NMRチャートを図1に示す。

化合物(7)

FAB-MS (positive) 842 (M+1)
FABマススペクトル・チャートを図2に、400MHz ¹H-NMRチャートを図3に、400MHz ¹H-NMRデータを図8に示す。

化合物(8)

FABマススペクトル・チャートを図4に、¹H-NMRチャートを図5に、IRチャートを図6に、UVチャートを図7に、200MHz ¹H-NMRデータを図9に示す。

¹H NMR (CDCl₃) δ 0.93 (t, J=6.0Hz, 12H CH₃ (ipr)), 1.04~1.50 (m, 10H, CH₃ CH₂), 1.52-1.73 (m, 4H, NCN₂ CH₂ CHe CH₃), 1.80-1.95 (m, 1H, H2'), 2.41 (t, J=5.3Hz, 1H, -CH₂ CN), 2.60 (t, J=5.3Hz, 1H, -CH₂ CN), 2.64-2.89 (m, 3H, HN, H2'), 3.25-3.44 (m, 4H, N-CN₂, CH₂, CN₂, CH₃), 3.45-3.72 (m, 4H, 5', -OCH₂ CH₂ CN),

21

3.74 (s, 6H, OCH₃), 4.17-4.30 (m, 1H, 4'), 4.52-4.84 (m, 3H, 3',), 6.46 (t, J=4.7Hz, 1H, 1'), 6.74 (d, J=6.3Hz, 4H,), 6.92-7.08 (m, 3H,), 7.10-7.43 (m, 6H,), 7.99 (s, 1/2H, 8), 8.00 (s, 1/2H, 8), 8.79 (brs, , 1H), 9.11 (s, 1H,)
³¹P NMR (COCl₂) (H₃PO₄ 外部標準)
 δ 149.28, 149.38

IR (CHCl₃) 340, 2968, 1566, 1509, 1403, 1299, 1249, 1178, 1036, 979 (P-N), 832 cm⁻¹ UV (C H₃ OH) 28600 (321nm) 24500 (260nm) 29000 (234nm)

FABMS (positive) (M+1)

(光学活性により、2つの異性体の1:1混合物)

【0054】

【発明の効果】上述したように本発明によれば、ポリヌクレオチドの合成に好適に使用可能なモノマーユニットたるデオキシリボヌクレオシド誘導体、およびその製造方法が提供される。

【0055】本発明のデオキシリボヌクレオシド誘導体は、通常の脱保護条件(55℃, 8時間程度)で、収率良くdA^{NH2}を複数個含むDNAを与えることが可能である(従来の保護基では通常の脱保護条件で、2日~5日間の長い反応時間が必要であった)。

【0056】本発明のデオキシリボヌクレオシド誘導体

22

を用いることにより、長いポリヌクレオチド(50mer程度)が容易に合成できる。

【0057】本発明のデオキシリボヌクレオシド誘導体においては、アデニンの2位にアミノ基を導入することによりチミンとの間の水素結合が増加し、水素結合に基づく相互の塩基の認識性が向上するため、アンチセンス法、ハイブリダイゼーション用のプローブとして、特に好適に使用可能である。

【図面の簡単な説明】

10 【図1】実施例で得られた化合物(6)の¹H-NMRチャートである。

【図2】実施例で得られた化合物(7)のFABマスペクトルを示すチャートである。

【図3】実施例で得られた化合物(7)の400MHzの¹H-NMRチャートである。

【図4】実施例で得られた化合物(8)のFABマスペクトルを示すチャートである。

【図5】実施例で得られた化合物(8)の¹H-NMRチャートである。

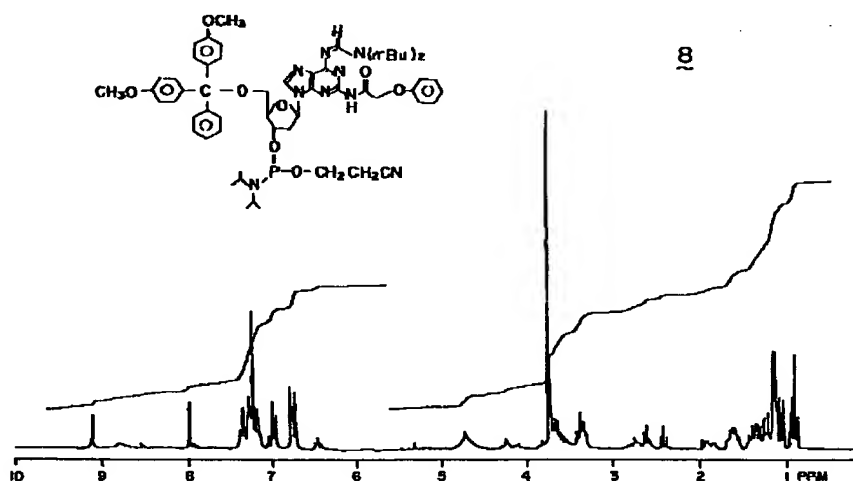
20 【図6】実施例で得られた化合物(8)のIRチャートである。

【図7】実施例で得られた化合物(8)のUVチャートである。

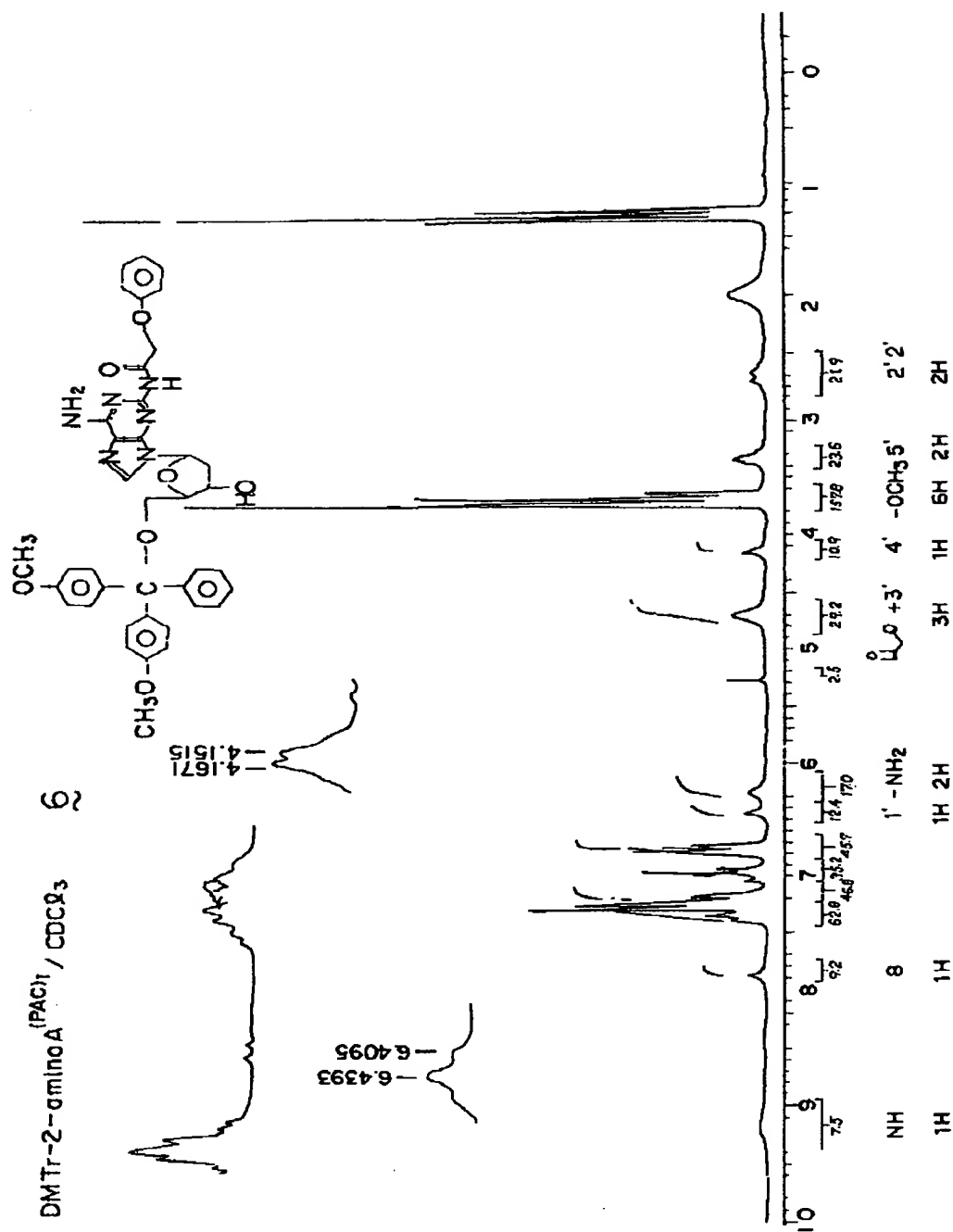
【図8】実施例で得られた化合物(7)の400MHzの¹H-NMRデータである。

【図9】実施例で得られた化合物(8)の200MHzの¹H-NMRデータ等の物性データである。

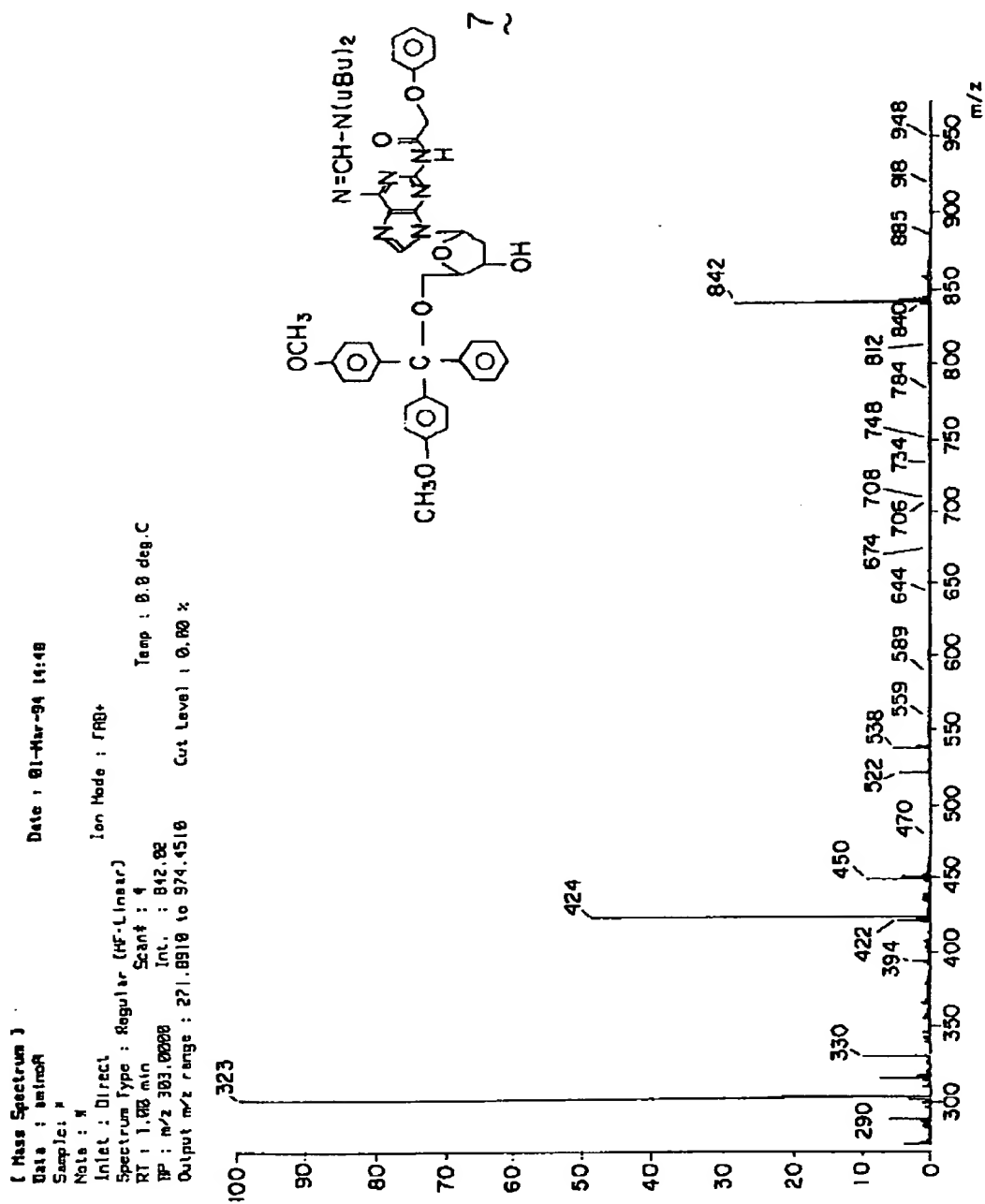
【図5】



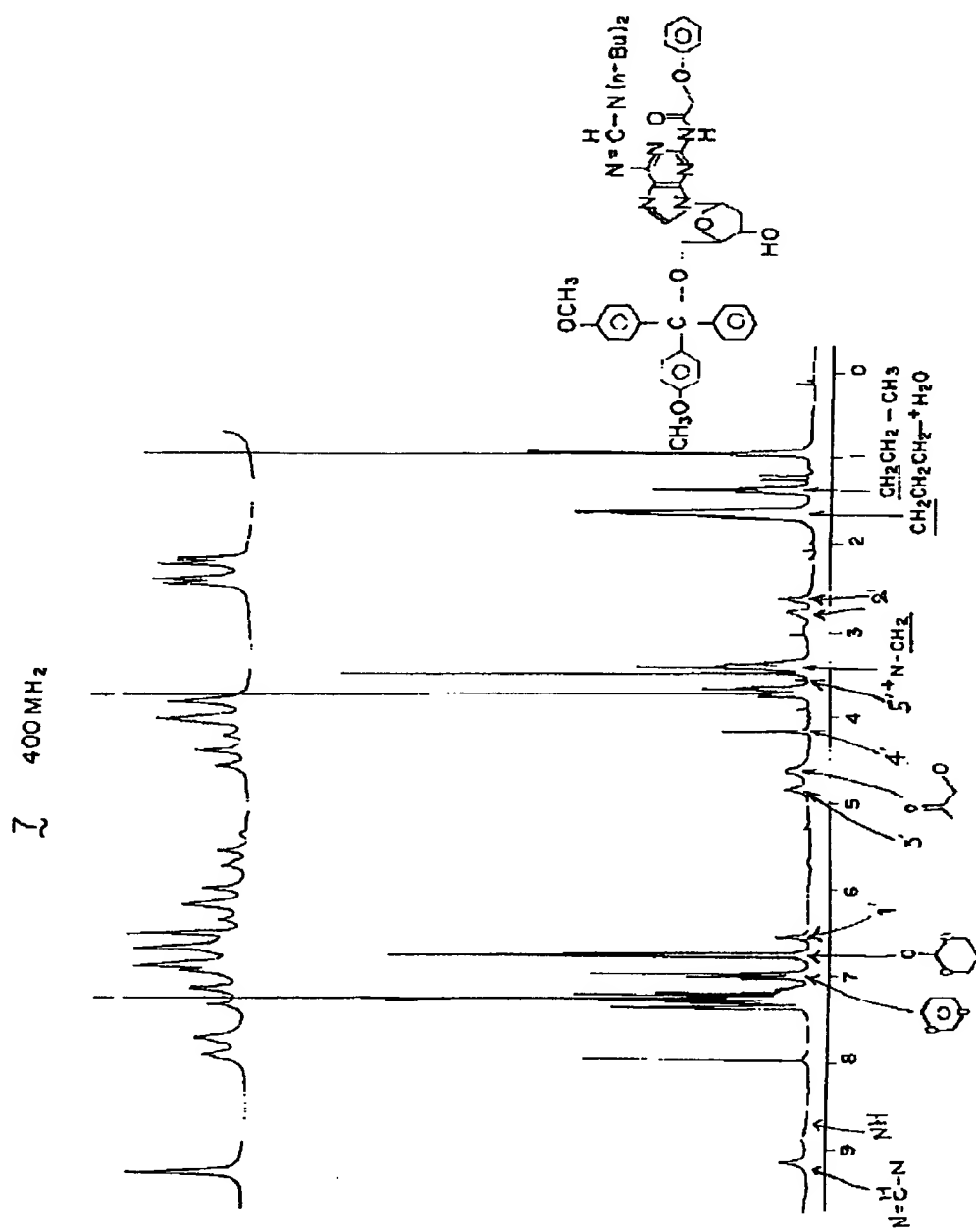
【図1】



【図2】

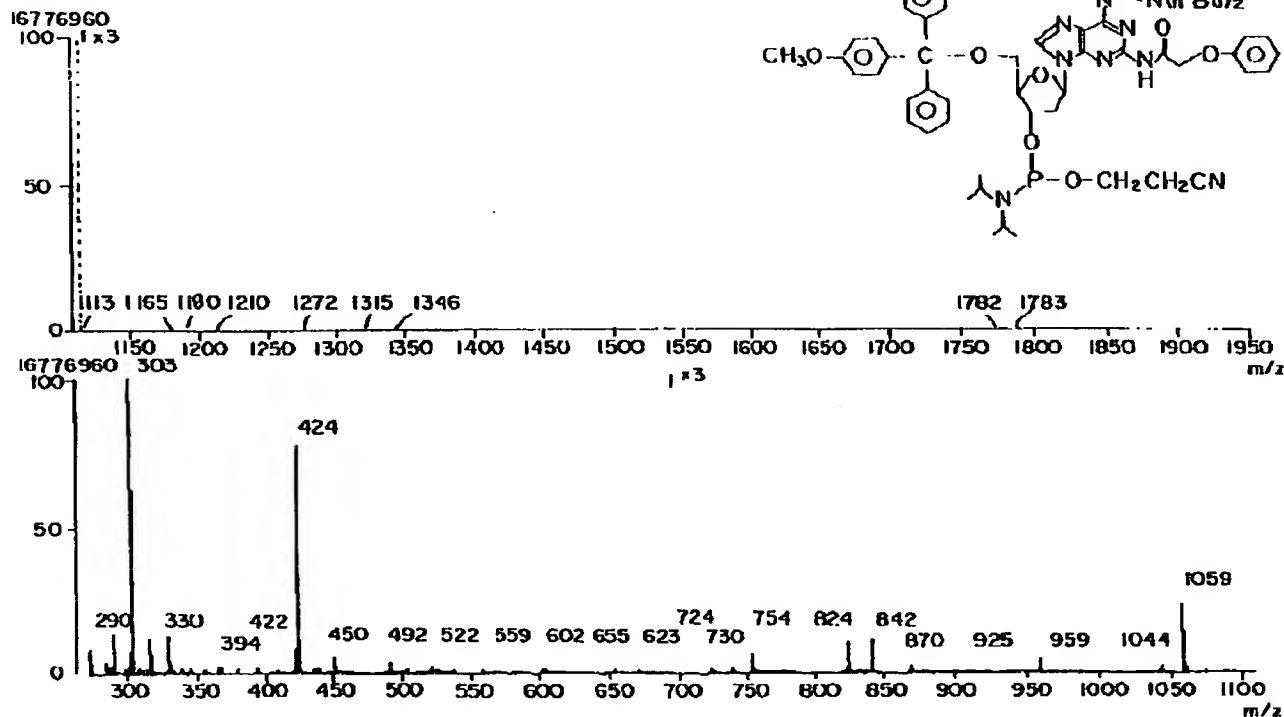


【図3】

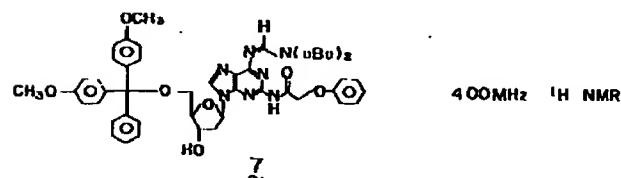


【図4】

{ Mass Spectrum }
 Data : DECIY-2H-H-R Date : 83-Mar-31 03:59
 Sample : #
 Rate : #
 Inlet : Direct Ion Mode : F+U
 Spectrum Type : Regular (M+Linear)
 RT : 1.34 min Scan : (4,6) Temp : 0.0 (deg.C)
 BF : m/z 303.0000 Int. : 1599.98
 Output w/e range : 271.0910 to 1952.8500 Cut Level : 0.00 %

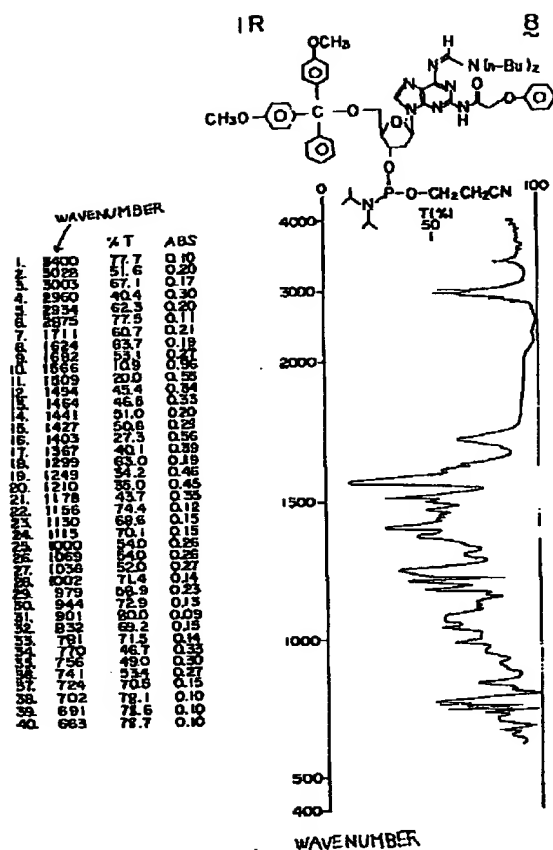


【図8】

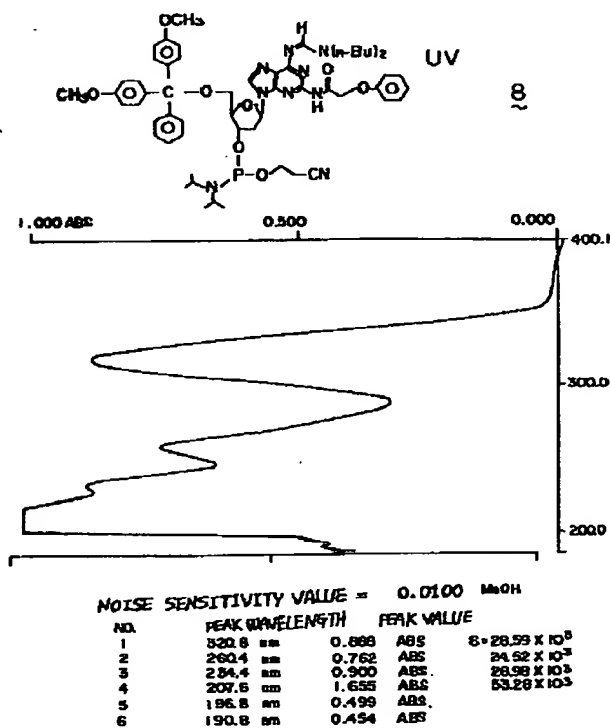


¹H 400MHz NMR(CDCl₃) δ: 0.93(t, J=7.3Hz, 6H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.30-1.43(m, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.58-1.69(m, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 2.62(ddd, J=12, 5.3, 3.3Hz, 1H, 2'), 2.71-2.82(m, 1H, 2'), 3.35(dd, J=10.7, 4.0Hz, 1H, 5'), 3.37-3.43(m, 5H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 3.73(s, 6H, OCH₃), 4.16(dd, J=8.7, 4.0 Hz, 1H, 4'), 4.62(brs, 2H, PhOCH₂CO), 4.78-4.88(m, 1H, 3'), 6.55(dd, J=5.3, 4.0 Hz, 1H, 1'), 6.75(dd, J=9.3, 2.7 Hz, 4H, methoxyphenyl-o), 6.97(dd, J=8.9, 1.3 Hz, 2H, phenoxy-o), 7.01(td, J=7.3, 1.3 Hz, 1H, phenoxy-p), 7.12-7.40(m, 11H, methoxyphenyl-p, phenyl, phenoxy-m), 7.96(s, 1H, 8), 8.87(brs, 1H, NH), 9.14(s, 1H, N=CH-N) FAB-MS(M+H)⁺=842.02

【図6】



【図7】



【図9】

¹H 200MHz NMR(CDCl₃) δ0.93(t, J=6.0Hz, 12H, CH₃(P-Pr)), 1.04-1.50(m, 10H, NCH₂CH₂CH₂CH₂), 1.52-1.73(m, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₂), 1.80-1.95(m, 1H, 2'), 2.41(t, J=5.3 Hz, 1H, CH₂CN), 2.60(t, J=5.3 Hz, 1H, CH₂CN), 2.64-2.89(m, 3H, 2', CH(CH₃)₂), 3.25-3.44(m, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₂), 3.45-3.72(m, 4H, 5', OCH₂CH₂CN), 3.74(s, 6H, OCH₃), 4.17-4.30(m, 1H, 4'), 4.52-4.84(m, 3H, PhOCH₂CO, 3'), 6.46(t, J=4.7 Hz, 1H, 1'), 6.74(d, J=6.3 Hz, 4H, methoxyphenyl-o), 6.92-7.08(m, 3H, phenoxy-o-p), 7.10-7.43(m, 11H, methoxyphenyl-p, phenyl, phenoxy-m), 7.99(s, 1/2H, 8), 8.00(s, 1/2H, 8), 8.79(bro, 1H, NH), 9.11(s, 1H, N=CH-N)

³¹P 200MHz NMR(CDCl₃) δ149.28, 149.38 (H₃PO₄外部標準)

IR(CHCl₃): 3400, 2968, 1566, 1509, 1403, 1299, 1249, 1178, 1036, 979(P-N), 832cm⁻¹

UV(CH₂OH): 28600(321nm), 24500(260nm), 29000(234nm)

FAB-MS: 1059(M+O+H)⁺, 1044(M+1)⁺, 960(M-N(IPr)₂+OH+H)⁺, 424(Base+H+1)⁺, 303(DMT)⁺

